

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790448

研究課題名（和文） ライソゾーム病における免疫異常の関与機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanisms underlying in the immunological abnormalities of lysosomal storage diseases.

研究代表者

山口 章（YAMAGUCHI AKIRA）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20381585

研究成果の概要（和文）：サンドホフ病(SD)は、遺伝子の異常により、糖脂質が蓄積する難病であるが、その詳細は解明されていない。本研究では、hexb^{-/-}マウス(SDマウス)を用いて中枢神経系における免疫異常について研究を行った。

神経症状が顕著なSDマウスの中枢神経系では、病態の進行に伴いcxc1-13遺伝子の顕著な発現を見出した。更にcxc1-13のSDマウスにおける役割解明のため、hexb^{-/-}、cxc1-13^{-/-}マウス(DKO)を作成し解析を行い、DKOマウスで病態の改善等が確認された。以上、CXCL-13はSDマウスの病態の進行に深く関与していることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：We have previously found that the progress neurologic disease induced in SD and hex^{-/-} mice, is associated with the production of pathogenic anti-glycolipid autoantibodies. In this study, we focused immunological abnormalities in the CNS. We employed Real-time PCR analysis to monitor gene expression in the terminal stage of hexb^{-/-} mice and found that gene associated with the immune responses were up-regulated. B lymphocyte chemoattractant CXCL-13 was one of there up-regulated genes and is expressed specifically in the CNS. To determine the role of the CXCL-13, the cxc1-13 gene was additionally disrupted in hexb^{-/-} mice, as it play a key role in the autoimmune disease. Clinical symptoms were improved and life spans were extended in the hexb^{-/-}, cxc1-13^{-/-} mice and the number of neuronal cells was also increased than hexb^{-/-} mice. These findings suggest that the expression of CXCL-13 plays an important role in the pathogenesis of neuropathy in hexb^{-/-} mice and therefore provides a target for novel therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ライソゾーム病、自己抗体、炎症反応、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病は特定疾患に指定された難病のひとつであり、ライソゾーム酵素

やその活性化因子および安定化タンパク質等の遺伝的異常、欠損により基質が分解されずにライソゾーム内に蓄積する疾患

群である。ライソゾーム病のひとつであるSD はライソゾーム酵素である β ヘキソサミニダーゼA,Bの欠損により、その基質であるGM2ガングリオシド,GA2を主体とする糖脂質、オリゴ糖などが分解されずにライソゾーム内に蓄積し、重篤な神経症状を含むさまざまな症状を呈して乳児期に死亡する病気である。

これまで、神経症状の発症は中枢神経系への蓄積が原因であると考えられ、遺伝子治療 (Yamaguchi et al. *J Mol Med.* 81:185-193, 2003) や、基質合成阻害剤、骨髄移植などの治療がSDマウスを用いて試みられてきた。しかし、興味深いことに骨髄移植をおこなったSDマウスは、中枢神経系における酵素活性およびGM2,GA2の減少は見られないのにも関わらず、神経症状と寿命の改善がみられた (*J Clin Invest* 101:1881-1888, 1998)。

この結果はSDの病態の進行には中枢神経系における蓄積だけでは無く、解明されていない他の因子も関与していることが示唆された。近年、そのメカニズムに関与する因子として、中枢神経系でマイクログリア細胞が活性化され、炎症性サイトカインが産生されていることが報告され、病態形成に関与している可能性が言われはじめた (*Nat Rev Neurosci.* 6(9):713-25, 2005.)。しかし、マイクログリアの活性化および、炎症性サイトカイン等の産生メカニズムは未だ明らかになっていない。我々は近年、末梢で抗GA2,GM2抗体が形成され、病気の進行とともに抗体価が上昇し、血液脳関門の破壊に伴い神経細胞に抗体が沈着することを見出した。ライソゾーム病の中ではゴーシェ病やバッテン病などで自己抗体の存在が報告されているが、自己抗体の病態への関与についてはほとんど検討されていなかった。そこで、FcR γ 鎖を欠損したSDマウス (FcDKOマウス) を作製したところ、神経症状発症の遅延および寿命が改善したことを報告した (Yamaguchi et al. *J Clin Invest.* 113:200-8, 2004.)。更に我々はSDマウスの胸腺において、B細胞遊走性ケモカインCXCL-13の発現を確認し、B1細胞

が増加している事を見出した (Yamaguchi A. *PLoS One.* 10:5(8) 2010)。

本研究では、SDマウスを用いて、自己抗体産生機序と病態への影響を解明することを目的としている。これら自己抗体産生機序と病態への影響を解明することにより、SDやゴーシェ病等のライソゾーム病において免疫機能の正常化をターゲットとした新たな治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

ライソゾーム病のひとつであるサンドホフ病(SD)は、ライソゾーム酵素の遺伝的欠損により、その基質である糖脂質が蓄積し、神経症状を呈して死亡する難病である。現在までに我々は、この病態の進行には、自己抗体が深く関与し、更に免疫機能を制御する中枢神経系、胸腺において、B細胞遊走性ケモカインCXCL-13の高発現と、胸腺については自己抗体産生に深く関与しているB1細胞が増加している事を見いだした。本研究では、サンドホフ病モデルマウス(SDマウス)のCXCL-13遺伝子を欠損させることにより、自己抗体産生機序と病態への影響を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 経時的に中枢神経系において炎症性サイトカインTNF- α , B細胞輸送性ケモカインcxc1-13の発現量を定量PCRにて確認した。

(2) cxc1-13の産生細胞を特定するため、免疫染色法若しくはMACS法を用いて各細胞を分離し、定量的PCR法を用いて特定した。

(3) cxc1-13^{-/-}マウスとhexb^{-/-}マウスを交配し、hexb^{-/-}, cxc1-13^{-/-}マウス(DKOマウス)を作成した。

(4) DKOマウスの寿命をカップランマイヤーの生存曲線で、運動能をロタロッドで、驚愕反応等は、クリニカルスコアで評価した。

(5) DKOマウスの病理学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

- ① 神経症状が顕著に表れる 15 週齢の SD マウスの中枢神経系におけるサイトカイン、ケモカインの発現量を定量的 PCR で確認した。その結果、サイトカイン IL-10, TNF- α 及び B 細胞遊走性ケモカイン cxcl-13 が顕著に発現していることが確認された。cxcl-13 は自己抗体産生に深く関与していることが知られて関節炎リュウマチ等の自己免疫疾患において病変部で高発現していることが知られている。事実、SD マウスの中枢神経系における cxcl-13 の発現量を定量した結果、自己抗体の産生量の増加に伴い、cxcl-13 の産生量も増加していることが確認された。更に MACS 法及び免疫染色法により発現細胞を検索した結果、マイクログリアが cxcl-13 を発現している事を見出した。
- ② 近年、組織特異的自己免疫疾患である多発性硬化症や重症筋無力症、関節炎リュウマチにおいても、病態の進行に伴い中枢神経系で cxcl-13 の高発現が知られており、病態の進行と深く関与していることが知られている。我々は蓄積病の中で自己抗体の産生が報告されているゴーシェ病、バッテン病なども SD と同様の機序で自己抗体が産生され、病態の進行に関与していると示唆していることから、の蓄積病における cxcl-13 の役割を加盟するため、SD マウスと cxcl-13^{-/-}マウスを掛け合わせ、DKO マウスを作成し、バッククロスを 5 代繰り返すことにより遺伝子を均一化した。
- ③ 作成した DKO マウスは SD マウスと比較して、中枢神経系、肝臓、精巣への糖脂質の蓄積量に変化は見られなかった。一方、15 週齢の DKO マウスは同週齢の SD マウスと比較して、顕著な胸腺、脾臓の萎縮、及びリンパ球の減少は確認されなかった。また、脾臓のリンパ濾胞において杯中心の顕著な形成も確認されなかった。15 週齢の DKO マウスでは、中枢神経系の大脳皮

質、視床等において神経細胞の欠落が顕著に低減しており、更に視床ではアポトーティック細胞の減少も確認された。15 週齢の SD マウスの小脳では、プルキンエ細胞が変性し、脱落しているが同週齢の DKO マウスでは明らかに改善していた。一方、15 週齢の DKO マウスでは大脳皮質、及び視床においてアストロサイト、及びマイクログリアの数に顕著な差は見られなかった。

- ④ cxcl-13 は病変部においてマクロファージやマイクログリアから産生され B 細胞を誘導するなど、自己免疫疾患では中心的な役割を担っているケモカインである。我々はこれまでの研究で、SD において蓄積している糖脂質に対して自己抗体が産生され、この自己抗体が神経細胞に沈着し、抗原抗体反応を起こすことにより病態が進行することを見いだしている。即ち、SD において、自己抗体産生機序の中心的役割を担っていると示唆される cxcl-13 を欠損させることに SD マウスの病態の進行が改善されることが予想される。現時点で n=5 の比較結果となるが、カッランマイヤーの生存曲線により、寿命を評価した結果、SD マウスの寿命が 15 週齢に対して、DKO マウスの寿命は 16-17 週齢と有意な改善している事が確認された。更に歩行、驚愕反応等の神経症状をクリニカルスコア評価した結果、SD マウスに比べて同週齢の DKO マウスでは顕著に改善していることが確認された。

(2) 成果の国内外における位置づけとインパクト

現在までに SD を含むライソゾーム病では、病態の進行に炎症反応が深く関与していることが見いだされているが、その原因を探求した研究として我々が初めて免疫異常における研究を発表した。これまで蓄積病ではゴーシェ病やバッテン病等で自己抗体の産生が認められており、病態への関与が示唆されているがそのメカニズムは全く解明されていない。特にゴーシェ病は中枢神経系に顕

著な蓄積が見られないのにも関わらず、顕著な神経症状を呈する。現在までのSDの研究やゴーシェ病の病態などからも確認できるように、蓄積以外に何らかの因子の関与によりライソゾーム病の病態は構成されており、その有力な因子として自己抗体の関与が示唆される。本研究はこれまでほとんど研究されていない蓄積病における免疫異常の解明を進めており、ライソゾーム病の病態の解明と免疫機能の正常化をターゲットとした新たな治療法の開発に繋がると考えられる。

(3) 今後の研究予定

他の研究論文を参考にすると cxcl-13 を欠損したSDマウスは、自己抗体の産生が押さえられるのと同時に、自己抗体産生までの免疫ネットワークの中で cxcl-13 より下流のネットワークが遮断されるため、病態の改善および、自己抗体の産生機序と病態への関与を解明することができると予想される。

今後は、更なるSDの病態メカニズムの解明を行うため下記の研究を行い自己抗体産生機序と病態への影響を解明する。

- ① 我々は胸腺において、自己抗体を産生するB1細胞が浸潤していることを見いだしており、また、中枢神経系においては Jeyakumar M らがリンパ球の浸潤を報告している。cxc1DKO マウスでは、B細胞の病変部への浸潤が抑制されていることが予想されるため、中枢神経系、及び胸腺に存在しているB細胞を含むリンパ球の特定、及び細胞数のカウントは、FACS法を用いて行う。また、その局在は、免疫染色法により行う。
- ② Bagaeva LV ら、CXCL-13 遺伝子欠損マウスにMOGペプチドでEAEを惹起した場合は、自己抗体の産生が抑制され、EAEスコアが抑制された事を報告している。cxc1DKOマウスにおいても、同様に抗原が存在している病変部へのB1細胞の遊走が上手くいかず、自己抗体の

産生が抑制されていると推測されるため、自己抗体の定量はELISA法にてそれぞれ評価する。

- ③ 平成23年度に行ったサイトカインの網羅的解析により、発現が認められたサイトカインを cxc1DKO マウスの中枢神経系、胸腺において、その発現が維持されているかを定量的PCR法を用いて評価する。この実験では、SDマウスの自己抗体産生機序において、CXCL-13の下流のネットワークのみの評価になるため、必要に応じてFcDKOマウスとも比較する。

- ④SDマウスの免疫異常をターゲットとした治療法の基礎研究として、免疫グロブリン大量療法(IVIg)、及びCXCL-13中和抗体をSDマウスに投与し、その治療効果をこれまで得られた知見を基に評価する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

- ① 鈴木京子、山口章、神崎誠一、都甲崇、勝瀬大海、青木直哉、河上緒、山口佳代子、幸光範子、藤田雅代、橋本款、山中正二、平安良雄：サンドホフ病モデルマウスにおける α -シヌクレインの機能と病態への関与、第85回日本生化学会大会福岡国際会議場(福岡県)、2012. 12. 16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 章 (YAMAGUCHI AKIRA)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20381585

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：